

10/550990

Patent Application No. 2003-084695

JC09 Rec'd PCT/PTO 26 SEP 2009

(Translation)

JAPAN PATENT OFFICE

5 This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

Date of Application: March 26, 2003

10 Application Number: Patent Application No. 2003-084695
[ST.10/C]: [JP2003-084695]

Applicant(s): LTT BIO-PHARMA CO., LTD.

15

March 30, 2004

20

Yasuo IMAI
Commissioner, Japan Patent Office

[Name of Document] Application for Patent
[Reference No.] P-1108
[Addresses] To Commissioner of the Patent Office
[IPC] A61K 38/00
5 [Inventor]
[Address]
[Name] 24-14-101, Chuo 5-chome, Ohta-ku, Tokyo
[Inventor]
[Address]
[Name] ISHIHARA, Tsutomu
10 [Inventor]
[Address]
[Name] 1-11, Umegaoka 1-chome, Setagaya-ku,
Tokyo
[Name] MIZUSHIMA, Yutaka
[Applicant for the Patent]
[Address] 5-1, Atago 2-chome, Minato-ku, Tokyo
[Name] LTT Bio-Pharma Co., Ltd.
15 [Representative]
[Identification No.] 100096758
[Patent Attorney]
[Name] TAKAHASHI, Tsuyoshi
[Charge]
20 [Account Number] 053958
[Total Amount] ¥21,000
[List of the Documents]
[Item] Specification 1
[Item] Abstract 1
25 [Proof] Requested

【Name of the Document】 DESCRIPTION

【Name of the Invention】 INTRAVENOUS NANOPARTICLES FOR
TARGETING DRUG DELIVERY AND SUSTAINED DRUG RELEASE

【Claims】

5 【Claim 1】 Intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release, characterized in that a low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug is made hydrophobic by metal ion and is encapsulated in nanoparticles formed with poly(lactic-co-glycolic acid) or poly(lactic acid), and a surfactant is applied to the surface of the nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid) or poly(lactic acid).

10 【Claim 2】 The intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to claim 1, wherein the particles have a diameter of 100 to 300nm.

15 【Claim 3】 The intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to claim 1 or 2, wherein the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug has a molecular weight of 1000 or lower.

20 【Claim 4】 The intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to any one of the claims 1 to 3, wherein the metal ion is any of zinc, iron, copper, nickel, beryllium, manganese, and cobalt.

25 【Claim 5】 The intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to any one of the claims 1 to 4, wherein the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug has a phosphate group to make the drug susceptible to hydrophobicization by the metal ion.

30 【Claim 6】 The intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to any one of the claims 1 to 5, wherein the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug has a carboxyl group to make the drug susceptible to hydrophobicization by the metal ion.

【Claim 7】 The intravenous nanoparticles for targeting drug

delivery and sustained drug release according to any one of the claims 1 to 6, wherein the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug is a steroidal anti-inflammatory drug, a non-steroidal anti-inflammatory drug, a prostanoid, an 5 antimicrobial drug, or an anticancer drug.

[Claim 8] A method for producing intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release, comprising the steps of:

10 hydrophobicizing a low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug by the use of metal ion;

dissolving or suspending, along with a poly(lactic-co-glycolic acid) or a poly(lactic acid), the hydrophobicized drug in a water-miscible organic solvent; and

15 adding the resulting solution or the suspension to an aqueous solution of a surfactant.

[Claim 9] The method for producing intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to claim 8, wherein the a water-miscible organic solvent is any of acetone, acetonitrile, ethanol, propanol, 20 dimethyl sulfoxide or dioxane.

[Claim 10] The method for producing intravenous nanoparticles for targeting drug delivery and sustained drug release according to claim 9, wherein the surfactant is a polyoxyethylene polyoxypropylene glycol, a polysorbate, a 25 polyoxyethylene octylphenyl ether, lecithin, or a polyvinylalcohol.

[Disclosure of the present invention]

【0001】

【Technical field】

30 The present invention relates to intravenous nanoparticles encapsulating low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drugs that are intended for the purposes of targeting drug delivery and sustained drug release. Specifically, the present invention relates to intravenous

nanoparticles which can deliver low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drugs to target lesion site where the particles gradually release the drugs over a prolonged period of time, and a production method thereof.

5 **[0002]**

[Background art]

Many researchers have developed and proposed poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) or poly(lactic acid) (PLA) microparticles and nanoparticles that encapsulate low-molecular weight, water-soluble drugs.

For example, PLGA microcapsules containing physiologically active polypeptides and a production method thereof (see Patent reference 1), and PLGA nanoparticles for intravascular administration containing various therapeutic agents are developed (see Patent reference 2). Also, a sustained-release formulation comprising PLGA microcapsules encapsulating physiologically active, water-soluble peptide compounds, which were prepared in the form of water-insoluble or hardly water-soluble polyvalent metal salts is developed (see Patent reference 3).

20 **[0003]**

However, none of these patent publications mention or suggest the concept of hydrophobicizing a low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug with the use of metal ions prior to the encapsulation of the drug into nanoparticles so as to make intravenous nanoparticles suitable for the targeting delivery and sustained release of drugs.

25 **[0004]**

The present inventors also have filed patent applications (e.g., Japanese Patent Application No. 2002-159190) concerning formulations comprising poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) or poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles. The nanoparticles suggested by the present inventors, however, could only offer a low encapsulation efficiency of the low-molecular weight,

water-soluble drugs.

【0005】

[Patent reference 1] US 4,652,441 (claims 1, 4)

5 [Patent reference 2] Japanese National Publication No. Hei 10-
(page 21 to 22)

[Patent reference 3] 511957 Japanese Patent Laid-Open
Publication No. Hei 8-217691 (Detailed description of the
invention, [0004], [0009])

【0006】

10 **【The problem to be solved in the invention】**

Accordingly, it is an objective of the present invention
to provide intravenous nanoparticles encapsulating a low-
molecular weight, water-soluble and non-peptide drug that are
capable of targeting a specific lesion site and are less
15 likely to burst at an early stage of administration so that
they can gradually release the drug at the lesion site over a
prolonged period of time. It is another objective of the
present invention to provide a simple method for preparing
such intravenous nanoparticles that enables large-scale
20 production of the product.

【0007】

In another words, the present inventors developed a
simple method for encapsulating a low-molecular weight, water-
soluble and non-peptide drug into PLGA or PLA nanoparticles
25 and nanoparticles for targeting drug delivery and sustained
drug release.

【0008】

【Means to solve the problem】

Specifically, the present inventors have examined the
30 possibility of allowing such low-molecular weight, water-
soluble and non-peptide drugs to bind to metal ion to impart a
hydrophobicity to the drugs, thereby facilitating
encapsulation of the drugs into PLGA or PLA nanoparticles.

【0009】

Specifically, the intravenous nanoparticles of the present invention designed for targeting drug delivery and sustained drug release comprise a low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug that has been hydrophobicized with a 5 metal ion and has been encapsulated in PLGA or PLA nanoparticles with a surfactant subsequently applied to their surfaces.

【0010】

In this regard, it has been found that the nanoparticles 10 of the present invention are most effectively taken up by the target lesion site when they have a diameter of 100 to 300nm. The nanoparticles having a diameter less than 100nm tend to be taken up by regions other than the intended lesion sites and are therefore undesirable, as are the nanoparticles having a 15 diameter larger than 300nm, which is not suitable for the 2 objective of the invention; sustained drug release and targeting.

【0011】

Among the metal ions suitable for this purpose are zinc 20 ion, iron ion, copper ion, nickel ion, beryllium ion, manganese ion, and cobalt ion.

【0012】

Of these, zinc ion and iron ion are particularly preferred.

【0013】

The low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug of the present invention preferably includes a phosphate group so that the drug can readily bind to the metal ion to become hydrophobic.

【0014】

The low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug of the present invention preferably includes a carboxyl group so that the drug can readily bind to the metal ion to become hydrophobic.

【0015】

Preferably, the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug has a molecular weight of 1000 or less.

【0016】

5 While various drugs can be used as the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug in the present invention, particularly preferred are water-soluble steroidal anti-inflammatory agents, non-steroidal anti-inflammatory agents, prostanoids, antimicrobial agents, and anticancer 10 agents.

【0017】

In one exemplary process of the present invention, the intravenous nanoparticles are produced in the following manner: The low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug is first bound to the metal ion to make the agent hydrophobic. The drug is then dissolved or suspended, along with PLGA or PLA, in a water-miscible organic solvent. The resulting solution or suspension is added to an aqueous solution of a surfactant and the mixture is stirred to obtain 20 the desired nanoparticles.

【0018】

Examples of the water-miscible organic solvents for use in the present invention include, but are not limited to, acetone, acetonitrile, ethanol, methanol, propanol, 25 dimethylformamide, dimethylsulfoxide, dioxane, and mixtures thereof.

【0019】

Examples of the surfactants include polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, polysorbates, polyoxyethylene 30 octylphenyl ethers, lecithin, and polyvinylalcohol.

【0020】

Preferably, the nanoparticles of the present invention so produced are purified by centrifugation, gel filtration, fiber dialysis, or ultrafiltration and are subsequently freeze-dried

for storage to ensure the stability of PLGA or PLA as ingredient.

【0021】

Upon freeze-drying, a stabilizing agent and an isotonizing agent are preferably added to the nanoparticles suspension so that the freeze-dried preparation can be resuspended for administration. Preferred examples of the stabilizing agent and isotonizing agent include sucrose and trehalose, which are preferably added in the range of 1 to 20%.

【0022】

The nanoparticles prepared in the above-described manner are intravenously administered to target various inflammatory sites, vascular lesions, infected sites, and malignant tumor tissues where the particles effectively accumulate and sustainedly release the encapsulated low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug over time to provide the desired biological activities for a prolonged period of time.

【0023】

Thus, in order for the nanoparticles to be usable as a medical formulation, it is important to control, depending on the intended purposes, the surface properties and the particle size of the nanoparticles, as well as the encapsulation rate and the release profile of the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug. For instance, the surface properties of the nanoparticles can be controlled by using different types of surfactants. Adjusting the particle size of the nanoparticles is important also because the distribution of the nanoparticles within living body is strongly influenced by the particle size. To this end, the size of the nanoparticles is adjusted by taking into account how well the particles accumulate to different lesion sites (e.g., inflammatory sites, vascular lesion sites, infected sites, and malignant tumor tissues). Specifically, the particle size can be adjusted by controlling the conditions during the

preparation of the nanoparticles, including the rate at which the aqueous phase is stirred, the amount of the organic solvent used, and the rate at which the organic solvent is added to aqueous phase.

5 **[0024]**

The efficiency of encapsulation of the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug largely depends on the physical properties of the low-molecular weight drug. Specifically, this is done by allowing the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug to bind to a metal ion in such a manner that the drug forms water-insoluble precipitates. For that purpose, such functional groups as phosphate and carboxyl, which are capable of binding to the metal ion, are preferably introduced into the molecules of the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug. It is also required that any functional groups present in the drug molecules that do not participate in, or interrupt, the formation of the precipitation with the metal ion must be protected with proper protective groups. Furthermore, the type and amount of the organic solvent used and the rate at which the organic solvent is poured also affect the particle size of the nanoparticles and therefore need to be optimized.

[0025]

To evaluate the nanoparticles of the present invention, it is essential to construct *in vitro* or animal (*in vivo*) models suitable for the evaluation of PK/PD (pharmacokinetics/pharmacodynamics) of the nanoparticles.

[0026]

As described above, the present invention has achieved a high encapsulation rate of the low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug into the PLGA or PLA nanoparticles by the use of metal ions to impart a hydrophobicity to the drug. The present invention allows the simple, industrial-scale production of the intravenous

nanoparticles designed for the purpose of targeting drug delivery to target lesion sites where the particles can gradually release the drug over a prolonged period of time.

【0027】

5 The present invention will now be described in detail with reference to examples and test examples.

【Example 1】 Formation of water-insoluble precipitates of low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drug with
10 metal ion

Each phosphate-containing compounds was dissolved in a 0.2M Tris-HCl buffer solution (pH7.8) to a concentration of 20mM. The solution was then added to equal volume of 100mM aqueous solutions of different metal ions. The turbidity of
15 each of the resulting mixtures was observed.

As can be seen from the results of Table 1, a significant turbidity and precipitate formation were observed in each of the phosphate-containing compounds in the presence of zinc, iron (ferric or ferrous), or copper ion.

20 When the molar ratio of the betamethasone phosphate to zinc ion and the molar ratio of riboflavin phosphate to zinc ion were varied to examine the amounts of the resulting precipitates, the precipitate formation was most significant for each of the low-molecular weight compounds when the molar
25 ratio with respect to zinc ion was approximately 1.

Table 1: Formation of precipitates of low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drugs with metal ions

| | | Low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drugs | | | | |
|------------|--------------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | | Naphthyl - phosphat e | betamethason e phosphate | Dexamethason e phosphate | riboflavi n phosphate | Tris-HCl buffer solution (0.1M/pH7.8) |
| Metal ions | NiCl ₂ | - | - | + | - | - |
| | CuCl ₂ | - | +++ | +++ | +++ | - |
| | Zn(CH ₃ COO) ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | ZnCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | MgCl ₂ | - | - | - | - | - |
| | FeCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | FeCl ₃ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | 3N HCl | - | - | - | - | - |

The resulting mixture was evaluated as follows:

- : the compound was dissolved;

5 +: the mixture was slightly turbid;

++: the mixture was significantly turbid;

+++: the mixture was significantly turbid and a precipitation was formed.

【0028】

10 (Example 2) Preparation of PLGA/PLA nanoparticles

Different steroids were dissolved in 100 μ l water and the resulting solutions were each added to 500 μ l of a 0.5M aqueous zinc acetate solution or 500 μ l of a 0.5M aqueous ferrous chloride solution. Each mixture was centrifuged at 12,000rpm 15 for 5min and the supernatant was discarded to obtain precipitates in the form of zinc-steroids or iron-steroids. To the precipitates, 500 μ l of acetone, an acetone/acetonitrile mixture, or an acetone/ethanol mixture dissolved 20mg PLGA or PLA (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) were added 20 respectively. To each of the resultant solutions, an aqueous solution of zinc acetate was added and the mixture was allowed to stand for 2 hours at room temperature. Subsequently, the solution (or suspension) was added at the rate of 1ml/min via

a 27G syringe to a 0.5% aqueous solution of Pluronic F68 (a nonionic high-molecular weight surfactant) stirring at 400rpm, to give nanoparticles. The resultant nanoparticles were stirred for 1 to 2 hours at room temperature, and a 0.5M 5 aqueous solution of EDTA (pH8) was added (0.4 by volume). The mixture was then centrifuged at 20,000G for 20min. Following the removal of the supernatant, the residue was resuspended in water and the suspension was again centrifuged to wash the nanoparticles. The resulting nanoparticles were added to a 2N 10 aqueous solution of NaOH to decompose PLGA/PLA, and the steroid content in the nanoparticles was determined by HPLC. Similarly, the amount of water-insoluble steroid was determined for the nanoparticles prepared by different method without metal ions.

15 Furthermore, precipitates formed by mixing 5mg betamethasone phosphate with zinc were dissolved in varying volume of acetone and then encapsulation efficiency of betamethasone phosphate incorporated in the nanoparticles was determined in the same manner as described above.

20 As shown in Table 2, the use of the precipitates of the steroid phosphates that were generated through the addition of zinc or ferrous ion (i.e., BP-Zn, BP-Fe, DP-Zn, and HP-Zn) significantly increased the encapsulation rate of the respective steroids into PLGA nanoparticles, as opposed to the 25 cases of the steroid phosphates provided in the form of sodium salts, each of which showed substantially no incorporation into the nanoparticles.

30 Table 3 shows the encapsulation rates of betamethasone phosphate into PLGA nanoparticles obtained by varying the amount of the solvent, acetone, while maintaining the amounts of PLGA and betamethasone phosphate. As can be seen from these results, the nanoparticles formed aggregates in 500 μ l or less of acetone. The particles on the other hand remained stably dispersed in 700 μ l acetone while showing a high encapsulation

rate of betamethasone phosphate into the nanoparticles.

Although the nanoparticles were stably dispersed in 700 μ l or more acetone, the encapsulation rates gradually decreased as the amount of acetone was increased.

5 Table 2: Encapsulation of steroids into PLGA nanoparticles

| Steroids | betamethasone | betamethasone acetate | BDP | BP-Na | BP-Zn |
|----------------------------|---------------|-----------------------|-------|-------|-------|
| Steroid/nanoparticle (wt%) | 0.01 | 0.15 | 0.47 | 0 | 2.03 |
| Steroids | BP-Fe | DP-Na | DP-Zn | HP-Na | HP-Zn |
| Steroid/nanoparticle (wt%) | 1.15 | 0 | 1.15 | 0 | 1.05 |

BDP: betamethasone dipropionate

BP: betamethasone phosphate

DP: dexamethasone phosphate

HP: hydrocortisone phosphate

10

Table 3: Effects of the volume of acetone on the encapsulation rate of betamethasone phosphate into PLGA nanoparticles

| Amounts of acetone(μ l) | 500 | 700 | 900 | 1100 | 1300 | 1500 |
|------------------------------|-----|------|------|------|------|------|
| Steroid/nanoparticle (wt%) | * | 7.34 | 4.28 | 3.46 | 2.71 | 1.93 |

* Data not obtained because of particle aggregation

15

【0029】

(Example 3) Steroid release profile from PLGA/PLA nanoparticles

5mg betamethasone phosphate was dissolved in 100 μ l water and the solution was added to 500 μ l of a 0.5M aqueous solution 20 of zinc acetate. The mixture was then centrifuged at 12,000rpm for 5min and the supernatant was discarded to obtain a zinc-steroid precipitate. To the precipitate, 500 μ l of acetone dissolved 20mg of PLGAs or PLAs with different molecular weights was added. The solution was allowed to stand for 2 hours at room temperature and was subsequently added, at a rate of 1ml/min with a 27G syringe, to a 0.5% suspension of either Pluronic F68 (a nonionic high-molecular weight

surfactant) or lecithin that had been stirred at 400rpm. The resulting nanoparticles were stirred for 1 to 2 hours at room temperature. Following the addition of EDTA, the nanoparticles were subjected to ultrafiltration on Centriprep YM-10 (Amicon) 5 for concentration and washing. The nanoparticles were then suspended in a mixture of FBS (fetal bovine serum)/PBS (v/v=1) at a 500 μ g/mL PLGA concentration and, after a predetermined period of time, a 0.5M aqueous solution of EDTA (pH8) was added (0.4 by volume). The suspension was then centrifuged at 10 20,000G for 30min and the supernatant was discarded. The residue was resuspended in water and the suspension was again centrifuged to wash the nanoparticles. The resulting nanoparticles were added to a 2N aqueous solution of NaOH to hydrolyze PLGA/PLA, and the steroid content in the 15 nanoparticles was determined by HPLC.

It was demonstrated that the nanoparticles encapsulating BDP (betamethasone dipropionate), a hydrophobic steroid, and prepared according to the method previously proposed by the present inventors (Japanese Patent Application No. 2002-20 159190) released a significant amounts of betamethasone at an early stage with approximately 90% or more of betamethasone having been released after 6 days. In contrast, the nanoparticles prepared according to the method of the present invention, in which the steroid's initial bursting release is 25 significantly reduced, released the steroid in a more gradual manner and were able to release it over an extended period of time. It has also been demonstrated that the nanoparticles made of PLGA or PLA with small molecular weights tend to release the steroid at an earlier stage and that the 30 nanoparticles made of PLGA tend to release the steroid earlier than those made of PLA.

Table 4: Release of betamethasone from nanoparticles

| PLGA/PLA | Cumulative betamethasone released (%) | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|------|------|------|------|-------|-------|
| | 5hrs | Day1 | Day2 | Day4 | Day8 | Day11 | Day20 |
| PLA (Mw 20000) | 27 | 53 | 64 | 79 | 97 | 98 | 100 |
| PLGA (Mw 10000) | 0 | 17 | 29 | 35 | 60 | 70 | 93 |
| PLGA (Mw 20000) | 0 | 11 | 18 | 34 | 47 | 53 | 62 |
| PLA (Mw 10000) | 0 | 12 | 13 | 25 | 28 | 30 | 38 |
| PLA (Mw 20000) | 0 | 3 | 4 | 8 | 10 | 14 | 31 |

【0030】

(Example 4) Release profile of steroids from nanoparticles internalized by macrophages

5 Macrophages were collected from the abdominal cavities of mice that had been stimulated by intraperitoneal administration of 1.5ml of 10% proteose peptone. The cells were inoculated at 6×10^5 cells/12 wells and were cultured overnight in Macrophage-SFM medium (Gibco). Subsequently, the 10 culture medium was replaced, and the PLGA or PLA nanoparticles prepared according to the procedures described in Example 3 were added. The cells were incubated at 37°C for another 2 hours. Subsequently, the cells were washed 8 times with PBS and the medium, and the amount of betamethasone in the medium 15 was determined at pre-determined intervals by ELISA method.

It was demonstrated that the nanoparticles encapsulating BDP (betamethasone dipropionate), a hydrophobic steroid, and prepared according to the method previously proposed by the present inventors (Japanese Patent Application No. 2002-20 159190) had released most of betamethasone as early as after 2 days. In contrast, the nanoparticles prepared according to the method of the present invention showed a nearly linear release profile during the first 2 to 3-day period and continued to gradually release betamethasone for a succeeding period.

Table 5: Release profiles of betamethasone from macrophages internalizing nanoparticles

| | Cumulative betamethasone released (%) | | | | | | | |
|--|---------------------------------------|------|-------|------|------|------|------|------|
| | 2hrs | 4hrs | 10hrs | Day1 | Day2 | Day3 | Day5 | Day7 |
| Control nanoparticles ^{*1} | 26 | 42 | 68 | 86 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| Nanoparticles of the present invention ^{*2} | 3 | 4 | 11 | 27 | 64 | 77 | 89 | 96 |

*1: Nanoparticles prepared using PLA (MW 10,000) (Japanese Patent Application No. 2002-159190)

5 *2: Nanoparticles prepared using PLGA (MW 10,000)
【0031】

(Example 5) Evaluation of dispersion stability of the nanoparticles

10 The acetone solutions prepared according to the procedures described in Example 3 were added dropwise to aqueous solutions of different surfactants to obtain nanoparticles. The resulting nanoparticles were concentrated, washed, purified, and were then freeze-dried in 10% sucrose solutions. The freeze-dried nanoparticles were resuspended in 15 water and particle sizes of the particles were measured using a light-scattering photometer.

20 Differences were observed among the surfactants in the size depending on the variations of the surfactants. Also, the nanoparticles prepared with a polyoxyethylene polyoxypropylene glycols solution were smallest in size than those prepared with other surfactants. The nanoparticles prepared with a polyvinylalcohol solution were largest in size than those prepared with other surfactants. Dispersion stability of the nanoparticles were high in both cases. Further, when the 25 concentration of the polyoxyethylene polyoxypropylene glycols solution and polysorbates solution are changed, higher the concentration is, higher the dispersion stability of the nanoparticles. The agglomeration was observed during freeze-drying when the nanoparticles were prepared with a 30 polyvinylalcohol solution. In contrast, particle size of the

nanoparticles became 152nm (SD±52nm) from 155nm (SD±44nm) after freeze drying when prepared with polyoxyethylene polyoxypropylene glycols, and polysorbates, thus found that re-dispersibility were high.

5 [0032]

(Example 6) Accumulation of nanoparticles in inflammatory sites

Inflammation was induced by injecting 100 μ l physiological saline containing 1% carrageenin in the left hind paw of male 10 Lewis rats. After 4 hours, single dosages of rhodamine-encapsulating nanoparticles of two different sizes (200nm and 500nm) were injected into a tail vein. 2 hours after administration, the resultant leg edema was cut and cryostat sections were prepared. The tissue samples were observed with 15 fluorescence microscopy.

The intensity of fluorescence observed in tissue sections was significantly higher in the group given the 200nm nanoparticles than in the group given PBS alone, indicating significant accumulation of the nanoparticles in the 20 inflammatory sites. No significant accumulation of the nanoparticles was observed in the group given rhodamine alone or the group administered with the 500nm nanoparticles.

[0033]

(Example 7) Activity to suppress adjuvant-induced arthritis

25 Arthritis was induced in 7-week old Lewis rats, weighing 130 to 160g and preconditioned for one week, by injecting, under ether anesthesia, 50 μ l of incomplete Freund's adjuvant solution (DIFCO) containing 6mg/mL *M. Butyricum* Desiccated (DIFCO) into the left hind paw. The animals were divided into 30 groups so that there are no significant differences between the groups in terms of the volume of the left hind leg of the animals. 14 days after administration of *M. Butyricum*, a single dose of 300 μ g PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate was administered intravenously to one

group. As controls, single doses of 600 μ g betamethasone phosphate or phosphate-buffered saline (PBS) were subcutaneously administered. The ability of the nanoparticles to suppress inflammation was analyzed by measuring the volume 5 of the left hind legs before and 5 days after the administration of the drug using water displacement technique.

The results are shown in Table 6 below. The nanoparticles of the present invention exhibited, as early as 1 day after 10 administration, a 45% suppression of the inflammation and continued to exhibit a strong effect over a succeeding 5-day period. In contrast, administration of 600 μ g betamethasone phosphate dose not show significant suppressive effect against inflammation compared to nanoparticles.

15 Table 6: Abilities of the nanoparticles to suppress adjuvant-induced arthritis

| Groups | Inflammation rate (%) after administration (# of days) ^{*3} | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Nanoparticles of the present invention (Betamethasone phosphate 300 μ g) | 45 | 40 | 36 | 34 | 31 |
| Betamethasone phosphate(600 μ g) | 36 | 23 | 23 | 20 | 15 |

*: Inflammation rate is found using the mean of 3 mice

【Name of the Document】 ABSTRACT

【Abstract】

【Purpose】 The present invention relates to intravenous nanoparticles encapsulating low-molecular weight, water-soluble and non-peptide drugs that are intended for the purposes of targeting drug delivery and sustained drug release and production method thereof.

【Means to solve the problem】 Provided are poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles that encapsulate a low-molecular weight and water-soluble drug and can deliver the drug to target legion sites where the particles gradually release the drug over a prolonged period of time. The nanoparticles are prepared by allowing the low-molecular, water-soluble and non-peptide drug to interact with a metal ion so as to make the drug hydrophobic, encapsulating the hydrophobicized drug into PLGA or PLA nanoparticles, and allowing a surfactant to be adsorbed onto the surface of the particles.

【Selected Figure】 None

20

Approval and Addition Information

Patent Application Number JP2003-084695
Reference Number 50300490725
5 Name of Document Application for Patent
Responsible Officer No.5 Upper Class 0094
Date Heisei 15 March 27

<Approval Information and Addition Information >

10 [Date of Submission] Heisei 15 March 26

Information on the applicant's personal history

Identification Number [303010452]

5 1. Date of Change February 25, 2003
[Reason for Change] New Registration
Address 5-1, Atago 2-chome, Minato-ku, Tokyo
Name LTT Bio-Pharma Co., LTD.

07.4.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

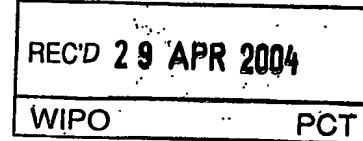
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月26日

出願番号
Application Number: 特願2003-084695

[ST. 10/C]: [JP2003-084695]

出願人
Applicant(s): 株式会社 LTTバイオファーマ

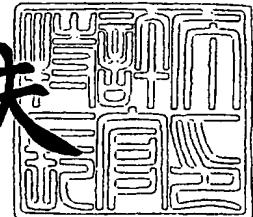


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 3月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-1108

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区中央5-24-14-101

【氏名】 石原 務

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区梅丘1-1-11

【氏名】 水島 裕

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都港区愛宕2丁目5番1号

【氏名又は名称】 株式会社 LTTバイオファーマ

【代理人】

【識別番号】 100096758

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 剛

【選任した代理人】

【識別番号】 100114845

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 雅和

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003414

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤とその製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属イオンにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子の表面に吸着させたことからなることを特徴とする徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項2】 前記乳酸-グリコール酸共重合体、乳酸重合体ナノ粒子の直径が100～300nmであることを特徴とする請求項1記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項3】 前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品の分子量が1000以下であることを特徴とする請求項1又は2記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項4】 前記金属イオンが、亜鉛、鉄、銅、ニッケル、ベリリウム、マンガン、コバルトのいずれかであることを特徴とする請求項1から3のいづれかに記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項5】 前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンにより疎水化されやすいようリン酸基を有していることを特徴とする請求項1～4のいづれかに記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項6】 前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンにより疎水化されやすいようカルボキシル基を有していることを特徴とする請求項1～5のいづれか1つに記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項7】 前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、ステロイド抗炎症薬、非ステロイド抗炎症薬、プロスタノイド、抗微生物薬又は抗癌薬であることを特徴とする請求項1～6のいづれかに記載の徐放性ターゲッティングを目的とし

た静脈注射用ナノ粒子製剤。

【請求項8】 前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンにより疎水化し、乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体と共に水溶性有機溶媒に溶解あるいは懸濁し、界面活性剤入りの水中に添加することから製造されることを特徴とする徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤の製造法。

【請求項9】 前記水溶性有機溶媒が、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール、プロパノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド、ジオキサンあるいはそれらの混合物であることを特徴とする請求項8に記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤の製造法。

【請求項10】 前記界面活性剤が、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル類、レシチン、ポリビニルアルコールであることを特徴とする請求項8または9に記載の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤及びその製造法に関し、詳しくは病変部位への水溶性非ペプチド性低分子医薬品のターゲッティングと病変部位での薬物の徐放を目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤及びその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、水溶性低分子医薬品を封入させた乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)または乳酸重合体(PLA)のマイクロ粒子ないしナノ粒子は、多くの研究者により開発されてきた。例えば、生物活性ポリペプチドを含有するPLGA等のマイクロカプセル及びその製法が開発されており(例えば、特許文献1参照。)、又、種々の薬物を含有するPLGA等の血管内投与可能なナノ粒子が開発されており(例えば、

特許文献2参照。）、さらに水溶性ペプチド性生理活性物質の水不溶性または水難溶性多価金属塩とPLGA等とを含有してなるマイクロカプセル徐放性製剤が開発されている（例えば、特許文献3参照）。

【0003】

しかし前記の先行特許においては、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンにより疎水化した徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子についてはなんら言及も示唆もしていない。

【0004】

本発明者らもPLGAまたはPLAナノ粒子製剤に関し特許を出願（特願2002-159190）してきたが、そのナノ粒子製剤では、水溶性低分子医薬品のナノ粒子内への封入率は低く、エステル化などにより疎水性の高い低分子医薬品にした場合でも薬物の徐放期間が短期に留まり徐放性が不十分であった。

【0005】

〔特許文献1〕

米国特許4,652,441（請求の範囲1, 4）

〔特許文献2〕

特表平10-511957（21頁～22頁）

〔特許文献3〕

特開平8-217691（発明の詳細な説明【0004】，【0009】）

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は医薬品化のための大量調製に適した簡便な調製法を構築し、水溶性非ペプチド性低分子医薬品が封入可能であり、水溶性非ペプチド性低分子医薬品の初期バーストが抑制され、長い期間徐放可能でかつ病変部位にターゲッティング可能な静脈注射用ナノ粒子製剤の提供を目的とする。

【0007】

即ち、本発明者らは、金属イオンを用い水溶性非ペプチド性低分子医薬品をPLGAまたはPLAナノ粒子内に効率的に封入する簡便な調製法及び徐放性ターゲッティング製剤を開発したものである。

【0008】**【課題を解決するための手段】**

水溶性非ペプチド性低分子医薬品をナノ粒子内に封入するために、本発明者は、金属イオンと水溶性非ペプチド性低分子医薬品との相互作用に着目し、その作用を利用してPLGAまたはPLAナノ粒子内に封入する方法について検討をおこなった。

【0009】

ここで調製されたナノ粒子製剤は、基材となる生分解性のPLGAまたはPLA、その基材中に埋包された水溶性非ペプチド性低分子医薬品と金属イオンおよび当該ナノ粒子表面に吸着させた界面活性剤からなる。即ち、本発明の徐放性ターゲッティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤は、金属イオンにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子の表面に吸着させたことからなるものである。

【0010】

ナノ粒子の直径が100～300nmであることが、病変部位に取り込まれやすい好適の範囲である。100nm以下は小さすぎて病変部位以外に入ってしまい、又300nm以上だと徐放性とターゲッティングという2つの目的を満足させることが出来ないからである。

【0011】

金属イオンとしては、亜鉛、鉄、銅、ニッケル、ベリリウム、マンガン、コバルトのいずれかであることが好適である。

【0012】

さらに、前記金属イオンのなかでも、亜鉛、鉄が特に好ましいものである。

【0013】

前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンと結合し疎水化され易いようリン酸基を有していることが好適である。

【0014】

前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、前記金属イオンと結合し疎水化され

易いようカルボキシル基を有していることが好適である。

【0015】

又、水溶性非ペプチド性低分子医薬品は、分子量1000以下であることが好適である。

【0016】

前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品が、ステロイド抗炎症薬、非ステロイド抗炎症薬、プロスタノイド、抗微生物薬あるいは抗癌薬であることが好適である。

【0017】

前記ナノ粒子製剤の製造法は、前記水溶性非ペプチド性低分子医薬品を前記金属イオンにより疎水化し、PLGAまたはPLAと共に水溶性有機溶媒中に溶解あるいは懸濁し、界面活性剤入りの水中に添加する方法である。

【0018】

前記水溶性有機溶媒としては、アセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール、プロパノール、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルフォキシド、ジオキサンあるいはそれらの混合物が好適である。

【0019】

また、前記界面活性剤としては、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンリコール類、ポリソルベート類、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル類、レシチン、ポリビニルアルコールが好適である。

【0020】

製造したナノ粒子製剤は、遠心、ゲルろ過あるいは限外ろ過により精製した後、基材であるPLGAあるいはPLAの安定性を考慮し、凍結乾燥処理して保存することが好適である。

【0021】

その際、凍結保存した製剤を再懸濁し投与できるようにするため、安定剤及び等張剤を加え凍結乾燥することが好適である。安定剤及び等張剤としては、1~20%になるようにショ糖あるいはトレハロースを用いることが好適である。

【0022】

なお、本発明のナノ粒子製剤は、炎症部位・血管病変部位・感染部位・悪性腫瘍組織にターゲッティングし、生物活性を持ったまま徐放可能な形態で水溶性非ペプチド性低分子医薬品を、乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子に封入したことからなるものである。

【0023】

このナノ粒子を製剤として利用するためには、ナノ粒子の表面物性・粒径・水溶性非ペプチド性低分子医薬品の封入率及び放出挙動などを制御することが重要である。表面物性は、界面活性剤の種類をかえることで制御可能である。同時に粒径も体内動態に大きく影響を及ぼすので、どの粒径が各種病変部位（炎症部位・血管病変部位・感染部位・悪性腫瘍組織）に取り込まれるかを検討する。粒径は調製時の水相の攪拌速度や有機溶媒量、有機溶媒の滴下速度などを変えることで制御可能である。

【0024】

水溶性非ペプチド性低分子医薬品の製剤への封入は水溶性非ペプチド性低分子医薬品の物性が大きく関与するが、金属イオンにより水溶性非ペプチド性低分子医薬品の沈殿を形成させることで可能となる。そのためには、水溶性非ペプチド性低分子医薬品にリン酸基、カルボキシル基といった官能基を導入することや沈殿形成に関与しない官能基ないし沈殿形成を阻害する官能基を保護するなど最適化をはかる必要がある。更に、有機溶媒の種類や量、有機溶媒の滴下速度も製剤の粒径に留まらず封入率にも影響を及ぼすので最適化する必要もある。

【0025】

更に、異なる分子量のPLGAやPLAを利用することで水溶性非ペプチド性低分子医薬品の徐放速度の制御ができる。開発した製剤の評価を行なうためには、PK/PD（薬物動態や薬理作用）の検討に適したin vitroあるいは動物（in vivo）モデルを構築することが重要である。

【0026】

前記のように、本発明では、金属イオンを用いることで、水溶性非ペプチド性低分子医薬品が高封入可能で、病変部位へ水溶性非ペプチド性低分子医薬品をターゲッティングし、かつ病変部位において長期にわたる水溶性非ペプチド性低分

子医薬品の徐放作用が継続する静脈注射用ナノ粒子製剤を、大量生産化に優位な簡便な方法にて製造されるものである。

【0027】

以下に本発明の実施例、試験例について記述する。

【実施例1】金属イオンによる水溶性非ペプチド性低分子化合物の沈殿形成

リン酸基を有した水溶性低分子化合物を20mMの濃度で溶解した0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH7.8)を、等量の種々の金属イオン水溶液中(100mM)に添加し、その濁りを観察した。

結果は表1に示したように、リン酸基を有した化合物は、亜鉛、鉄(二価あるいは三価)、銅存在下で濁りや沈殿形成が観察された。

また、リン酸ベタメサゾンあるいはリン酸リボフラビンと亜鉛のモル比を変えて沈殿形成量を解析した結果、いずれも亜鉛とのモル比が約1で低分子化合物の沈殿が生じることが明らかになった。

表1 水溶性非ペプチド性低分子化合物の金属イオンによる沈殿形成

| | | 水溶性低分子化合物 | | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------------------|
| | | ナフチル リン酸 | リン酸ベ タメサゾ ン | リン酸デ キサメサ ゾン | リン酸リ ボフラビ ン | Tris-Cl 緩衝液 (0.1M, pH7.8) |
| 金 屬 イ オ ン | NiCl ₂ | - | - | + | - | - |
| | CuCl ₂ | - | +++ | +++ | +++ | - |
| | Zn(CH ₃ COO) ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | ZnCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | MgCl ₂ | - | - | - | - | - |
| | FeCl ₂ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | FeCl ₃ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| | 3N HCl | - | - | - | - | - |

10mM濃度で水溶性低分子化合物を溶解したTris-Cl緩衝液(0.1M, pH7.8)と50mM濃度の金属イオン水溶液を同量混合しその濁りを観察した。

-：溶解状態、+：わずかに濁りが観察、++：濁りが観察、+++：濁りが生じ沈殿が形成

【0028】

(実施例2) PLGA/PLA製剤の製造法

種々の水溶性非ペプチド性低分子医薬品を100μlの水中に溶解し、0.5M酢酸亜鉛水溶液あるいは0.5M塩化第1鉄水溶液500μl中に添加した。12000rpm・5分間遠心し、上清を除去し亜鉛-ステロイドあるいは鉄-ステロイドの沈殿を得た。

この沈殿物中に、PLGA(和光)あるいはPLA(和光)20mgを溶解したアセトン、アセトン/アセトニトリル混合液あるいはアセトン/エタノール混合液を500 μ l添加した。2時間室温で静置後、この溶液（または懸濁液）を400rpmで攪拌した0.5%PluronicF68水溶液中に1ml/minの速度で27Gのシリンジを通し添加した。得られたナノ粒子は、1~2時間室温で攪拌しながら放置後、2.5分の1ボリュームの0.5MのEDTA水溶液(pH8)を加え、20000gで20分遠心した。上清を除去した後水を加え再度遠心によりナノ粒子を洗浄した。得られたナノ粒子は、2NのNaOH水溶液中でPLGA/PLAを分解し、HPLCにてナノ粒子中のステロイド量を定量した。また、金属イオンを加えずに調製したナノ粒子や非水溶性ステロイドに関しても同様に定量した。

さらに、リン酸ベタメサゾン5mgを亜鉛により形成させた沈殿を、種々の量のアセトンに溶解し、同様にナノ粒子中に封入されたリン酸ベタメサゾン量を定量した。

結果は表2に示したように、金属イオンが存在しない場合には、全くナノ粒子内にリン酸ステロイドが封入されないのでに対し、亜鉛あるいは第1鉄の添加により生じたリン酸ステロイドの沈殿(BP-Zn, BP-Fe, DP-Zn, HP-Zn)を用いたことで顕著にPLGAナノ粒子内への封入率が増加することが明らかになった。

また、表3に示したように、PLGAやリン酸ベタメサゾン量を一定としてその溶媒のアセトン量を変化させたところ、500 μ l以下ではナノ粒子が凝集してしまったが、700 μ lでは分散安定性が高くリン酸ベタメサゾンが高濃度封入されたナノ粒子が調製され、それ以上のアセトン量では分散安定性は高いが徐々に封入率が低くなることが明らかになった。

表2 PLGAナノ粒子内へのステロイドの封入

| ステロイド | ベタメサゾン | 酢酸ベタメサゾン | BDP | BP-Na | BP-Zn | BP-Fe | DP-Na | DP-Zn | HP-Na | HP-Zn |
|---------------------|--------|----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ステロイド/ナノ粒子 (重量%) | 0.01 | 0.15 | 0.47 | 0 | 2.03 | 1.16 | 0 | 1.15 | 0 | 1.05 |

BDP：ベタメサゾンジプロピオネート、BP：リン酸ベタメサゾン、DP：リン酸デキサメサゾン、HP：リン酸ヒドロコルチゾン

表3 アセトン量がPLGAナノ粒子内へのリン酸ベタメサゾンの封入率に及ぼす影響

| アセトン量(μl) | 500 | 700 | 900 | 1100 | 1300 | 1500 |
|---------------------|-----|------|------|------|------|------|
| ステロイド/ナノ粒子 (重量%) | 注 | 7.34 | 4.28 | 3.46 | 2.71 | 1.93 |

注：粒子が凝集し測定できず

【0029】

(実施例3) PLGA/PLA製剤からのステロイド放出挙動

リン酸ベタメサゾン5mgを100μlの水中に溶解し、0.5M酢酸亜鉛水溶液500μl中に添加した。12000rpm・5分間遠心し、上清を除去し亜鉛-ステロイドの沈殿を得た。この沈殿物中に、分子量の異なる種々のPLGAあるいはPLA20mgを溶解したアセトンを500ul添加した。2時間室温で静置後、この溶液を400rpmで攪拌した0.5%PluronicF68水溶液中に1ml/minの速度で27gシリンジを通し添加した。得られたナノ粒子は、1~2時間室温で攪拌しながら放置後、EDTAを加えた後、限外ろ過(アミコン、centriprepYM-10)で濃縮洗浄した。このナノ粒子製剤をFBS(ウシ胎児血清)/PBS(v/v=1)中にPLGA濃度として500μg/mlとなるように懸濁し、所定時間後2.5分の1ボリュームの0.5MのEDTA水溶液(pH8)を加え、20000gで20分遠心した。上清を除去した後水を加え再度遠心によりナノ粒子を洗浄した。得られたナノ粒子は、2NのNaOH水溶液中でPLGA/PLAを分解し、HPLCにてナノ粒子中のステロイド量を定量した。

結果は表4に示したように、本研究者らにより既に出願中の特許出願(特願2002-159190)に記載した疎水性ステロイドのBDP(ベタメサゾンジプロピオネート)を封入したナノ粒子製剤からは、初期に早くステロイドが放出され6日後には9割以上がナノ粒子から放出されているのに対し、前記調製法で調製したナノ粒子では、初期のバースト放出が著しく抑制され、さらにその後も徐々にステロイドが放出されることが明らかになった。また、分子量が小さいPLGAあるいはPLAで調

製したナノ粒子の方が、さらには、PLAよりもPLGAで調製したナノ粒子の方が、より早くステロイドが放出されることが明らかになった。

表4 ナノ粒子からのベタメサゾン放出挙動

| | ベタメサゾン累積放出量(%) | | | | | | |
|--|----------------|----|----|----|----|-----|-----|
| | 5時間 | 1日 | 2日 | 4日 | 8日 | 11日 | 20日 |
| 既に出願中の特許の方法により調製したナノ粒子 PLA (分子量 20000) | 27 | 53 | 64 | 79 | 97 | 98 | 100 |
| PLGA (分子量 10000) | 0 | 17 | 29 | 35 | 60 | 70 | 93 |
| 本出願特許の方法により調製したナノ粒子 PLGA (分子量 20000) | 0 | 11 | 18 | 34 | 47 | 53 | 62 |
| PLA (分子量 10000) | 0 | 12 | 13 | 25 | 28 | 30 | 38 |
| PLA (分子量 20000) | 0 | 3 | 4 | 8 | 10 | 14 | 31 |

【0030】

(実施例4) マクロファージに取り込まれたナノ粒子からのステロイド放出挙動

10%プロテオースペプトンを1.5ml腹腔内投与して刺激したマウスの腹腔からマクロファージを採取し、600,000cells/12wellで播種しマクロファージSFM培地(Gibco)により一晩培養した。培地交換後、実施例3に従い調製したPLGAまたはPLAナノ粒子を添加し、2時間37°Cでインキュベートした。PBS及び培地で8回細胞を洗浄した後、所定時間ごとに培地中に含まれるベタメサゾン量をELISAにより定量した。

結果は表5に示したように、本研究者らにより既に出願中の特許出願(特願2002-159190)に記載した疎水性ステロイドのBDPを封入したナノ粒子からは、初期にステロイドが放出され2日後にはほとんどが放出されているのに対し、上記調製法で調製したナノ粒子では、およそ2~3日後までは0次放出に近い挙動を示しその後もゆるやかに放出され続けることが明らかになった。

表5 ナノ粒子を取り込んだマクロファージからのベタメサゾン放出挙動

| | ベタメサゾン累積放出量(%) | | | | | | | |
|-------------------------|----------------|-----|------|----|----|----|----|----|
| | 2時間 | 4時間 | 10時間 | 1日 | 2日 | 3日 | 5日 | 7日 |
| 既に出願中の特許の方法により調製したナノ粒子* | 26 | 42 | 68 | 86 | 96 | 97 | 98 | 99 |
| 本出願特許の方法により調製したナノ粒子* | 3 | 4 | 11 | 27 | 64 | 77 | 89 | 96 |

*いずれのナノ粒子もPLGA(分子量10000)にて調製

【0031】

(実施例5) PLGA製剤の分散安定性評価

実施例3に従い調製したアセトン溶液を様々な界面活性剤を溶解した水中に滴下することでナノ微粒子をえた。得られたナノ微粒子を濃縮・洗浄・精製し、10%ショ糖溶液中で凍結乾燥した後、再度水を添加することでナノ微粒子の再分散性を光散乱計により評価した。

界面活性剤の種類により粒径が異なるナノ微粒子がえられた。ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類を用いると最も小さなナノ微粒子が、ポリビニルアルコールでは最も大きなナノ微粒子がえられることがわかった。また、分散安定性はいずれでも高いことが明らかになった。さらに、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類の濃度を変化させると濃度が高いほど分散安定性の高いナノ微粒子がえられることがわかった。凍結乾燥処理により、ポリビニルアルコールで調製したナノ微粒子では凝集が生じたのに対し、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレングリコール類、ポリソルベート類で調製したナノ微粒子では、凍結乾燥前の粒径が155nm(SD値±44nm)、凍結乾燥後の粒径が152nm(SD値±52nm)となり、再分散性が高いことが明らかになった。

【0032】

(実施例6) ナノ微粒子の炎症部位への集積性

Lewis系雌ラットの左足の足底に 1%カラゲニン含有生理食塩水を100 μ l投与し、4時間後、平均粒径が200nmあるいは500nmのローダミンを封入したナノ粒子を尾静脈より単回投与した。2時間後に、足浮腫を切除しクリオスタットにより凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により観察した。

200nmのナノ微粒子を投与した場合には、切片像の蛍光強度がPBSだけを投与した切片像に比べ著しく増大しており、ナノ微粒子が炎症部位に集積していることが明らかになった。また、ローダミンのみを投与した場合、あるいは500nmのナノ微粒子を投与した場合には、ほとんど炎症部位への集積性がみとめられなかつた。

【0033】

(実施例7) アジュバンド関節炎抑制作用

体重130～160gの7週齢Lewis系ラットを、エーテル麻酔下にて6mg/ml M. Butyricum Desiccated (DIFCO) 含有アジュバンド Incomplete Freund (DIFCO) 溶液50μlを左後肢足蹠皮内に注射した。M. Butyricum投与14日後、左後肢容積を指標に各実験群間に隔たりがないように分けた。一群のラットに、300μgのリン酸ベタメサゾンを封入したナノ粒子を単回静脈内投与した。また、対照として、他の群のラットに600μgのリン酸ベタメサゾンあるいはPBS（リン酸緩衝生理食塩液）をそれぞれ単回皮下投与した。関節炎の炎症抑制作用は、薬物投与前、投与後5日間の左後肢容積を水置換法で測定することで解析した。

結果は表6に示した。ナノ粒子を投与したラット群では、1日後45%まで炎症を抑制し、その後5日間にわたり高い炎症抑制効果が維持された。一方、600μgのリン酸ベタメサゾンを投与した場合には、ナノ粒子ほどの強い抑制効果が認められなかった。

表6 ナノ粒子によるアジュバンド関節炎抑制効果

| | 関節炎抑制率(%)* | | | | |
|---------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 投与後 1日 | 投与後 2日 | 投与後 3日 | 投与後 4日 | 投与後 5日 |
| ナノ粒子 (リン酸ベタメサゾン 300μg) | 45 | 40 | 36 | 34 | 31 |
| リン酸ベタメサゾン 600μg | 36 | 23 | 23 | 20 | 15 |

*抑制率はラット3匹の平均値

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 病変部位へ非ペプチド性低分子医薬品をターゲッティングし、病変部位において徐放することが可能であり、かつ水溶性非ペプチド性低分子医薬品を高濃度で封入可能な静脈注射用ナノ粒子製剤及びその製造法を提供すること。

【解決手段】 金属イオンにより疎水化した水溶性非ペプチド性低分子医薬品を乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子に封入し、界面活性剤を当該乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体ナノ粒子の表面に吸着させたことからなる。その製造法は、水溶性非ペプチド性低分子医薬品を金属イオンにより疎水化し、乳酸-グリコール酸共重合体または乳酸重合体と共に水溶性有機溶媒に溶解あるいは懸濁し、界面活性剤入りの水中に添加することである。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|---------------------|
| 特許出願の番号 | 特願2003-084695 |
| 受付番号 | 50300490725 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 |
| 作成日 | 0094 平成15年 3月27日 |

<認定情報・付加情報>

| | |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成15年 3月26日 |
|-------|-------------|

次頁無

出証特2004-3026059

出願人履歴情報

識別番号 [303010452]

1. 変更年月日 2003年 2月25日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都港区愛宕2丁目5番1号
氏名 株式会社 LTTバイオファーマ